Aus der Hautklinik der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. Dr. A. Greither)

Induktion des Cytochrom P-450-Systems der experimentellen Hexachlorbenzol-Porphyrie unter besonderer Berücksichtigung der Geschlechtsunterschiede

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Werner Fuchs

Düsseldorf 1978

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544323_0073

Aus der Hautklinik der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. Dr. A. Greither)

Induktion des Cytochrom P-450-Systems der experimentellen Hexachlorbenzol-Porphyrie unter besonderer Berücksichtigung der Geschlechtsunterschiede

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Werner Fuchs

Düsseldorf 1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

Dekan: Prof. Dr. H. Reinauer

Referent: Prof. Dr. G. Goerz
Coreferent: Prof. Dr. F. Schübel

Meiner lieben Mutter gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. EINLEITUNG 1

1.1. Die Porphyrinkrankheiten 1
1.2. Porphyria cutanea tarda 1
1.3. Die Epidemie in der Türkei: Hexachlorbenzol-Porphyrie 3
1.4. Themastellung der vorliegenden Arbeit 4

2. MATERIAL UND METHODEN 5

2.1. Tiere und Versuchsanordnung 5
2.2. Versuchsanordnung und Methoden 5
2.2.1. Herstellung des Leberhomogenats 5
2.2.2. Bestimmung der Desalkylierungsaktivität 6
2.2.3. Bestimmung der Porphyrine und ihrer Vorstufen 10
2.3. Chemikalien und Materialien 12
2.4. Geräte 13

3. ERGEBNISSE 14

3.1. Desalkylierungsaktivität für 7-Aethoxycumarin in der Leber 14
3.2. pH-Optimum und MICHAELIS-Konstante der Enzym-Reaktion 14

Seite

3.3. Hemmung der enzymatischen Desalkylierung 15

3.4. Ausscheidung der Porphyrine und ihrer Vorstufen im Urin 15

4. DISKUSSION 26

5. ZUSAMMENFASSUNG 32

6. LITERATUR 34

7. DANKSAGUNGEN 40

8. LEBENSLAUF 41

ABKÜRZUNGEN

ALA	5-Aminolaevulinsäure
E	Extinktion
HCB	Hexachlorbenzol
K_M	MICHAELIS-Konstante
MG	Molekulargewicht
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Hydrogenphosphat
PBG	Porphobilinogen
PCT	Porphyria cutanea tarda
THF	Tetrahydrofuran

1. EINLEITUNG

1.1. DIE PORPHYRINKRANKHEITEN

Die Porphyrinkrankheiten sind durch eine Störung der Haem-Biosynthese charakterisiert. Dabei kommt es zu einer Überproduktion und einer vermehrten Ausscheidung der Porphyrine und/oder ihrer Vorstufen im Urin und/oder der Porphyrine im Stuhl. Die Porphyrin-Stoffwechselstörungen beim Menschen und die experimentellen Porphyrien beim Tier sind durch typische Ausscheidungsmuster der Porphyrine (z.B. URO-, HEPTA-, PENTA-Porphyrine usw.) und ihrer Vorstufen, 5-Aminolaevulinsäure (ALA) und Porphobilinogen (PBG), gekennzeichnet.

Bereits seit dem vorigen Jahrhundert sind die Porphyrinkrankheiten bekannt, und man unterteilt sie nach der Lokalisation der vorherrschenden Stoffwechselstörung in erythropoetische und hepatische Porphyrien (DOSS und MEINHOFF (10)).

1.2. PORPHYRIA CUTANEA TARDA (PCT)

Die Porphyria cutanea tarda (PCT) ist nicht nur die häufigste hepatische Porphyrie, sondern auch die am weitesten

verbreitete Porphyrin-Stoffwechselstörung überhaupt. Die typischen Symptome dieser Krankheit an der Haut sind Blasenbildung, Elastose sowie Pigmentierung an den am stärksten lichtexponierten Hautpartien. Weiterhin ist die Dunkelfärbung des Urins ein vorherrschendes Symptom der Porphyria cutanea tarda. Im Urin findet man in erster Linie eine starke Vermehrung der URO- und HEPTA-Porphyrine (1, 11, 12, 17).

Die pathogenetische Grundlage der PCT ist eine Störung der Leberzellfunktion mit einer Mehrbildung oder einer Fehlbildung nicht für die Haem-Synthese verwertbarer Porphyrine, vorwiegend URO- und HEPTA-Porphyrine. Aufgrund dieser Befunde wird eine Decarboxylierungs-Störung der Porphyrine angenommen, die bei entsprechender Belastung der Haem-Biosynthese zur Dekompensation und damit zur Manifestation der PCT führt (11). Als Ursache kommen zahlreiche, die Haem-Biosynthese beeinflussende Faktoren in Frage, wie chemische Substanzen, Schwermetalle (Pb), aber auch zahlreiche Arzneimittel (z.B. Phenobarbital, Rifampicin) (22, 30, 37, 38, 39).
Daneben spielen aber auch Umweltstoffe (Xenobiotika), so z.B. chlorierte Kohlenwasserstoffe, besonders chlorierte Benzole, und Dibenzofurane, eine Rolle. Eine besondere Bedeutung hat das Hexachlorbenzol, ein als Fungizid verwendeter Kohlenwasserstoff.

1.3. DIE EPIDEMIE IN DER TÜRKEI: HEXACHLORBENZOL(HCB)-PORPHYRIE

Im Jahre 1956 führte in der Türkei die Verwendung von mit Hexachlorbenzol (HCB) behandeltem Saatweizen zur Herstellung von Brot zu einer Porphyrie-Epidemie (3, 4, 29). Nach dem Verzehr von HCB-kontaminiertem Weizen traten bei etwa 3.000 Menschen die Symptome der PCT auf: Lichtempfindlichkeit, Hyperpigmentierung und Vergrößerung der Leber. Als zusätzliche Symptome fanden sich Osteoporose, Vergrößerung der Schilddrüse und der Lymphknoten.

Dieser Zwischenfall führte dazu, daß zahlreiche medizinische und naturwissenschaftliche Disziplinen sich in den folgenden Jahren mit den biochemischen und pharmakologischen Eigenschaften des HCB und verwandter chemischer Substanzen beschäftigten.

Die chronische Verfütterung von HCB kann bei verschiedenen Tierspezies in unterschiedlicher Ausprägung zu einer Porphyrie führen. Umgekehrt gibt es auch Tierarten, z.B. die Maus, bei denen durch HCB keine Porphyrie auslösbar ist (5, 27, 33, 39, 40). In den folgenden Jahren konnte gezeigt werden, daß die HCB-Applikation bei Ratten zu einer Porphyrie führt, die ein geeignetes Modell zur Untersuchung der Pathogenese der menschlichen PCT darstellt. Der molekular-biologische Wirkungsmechanismus des HCB ist bis heute nicht geklärt. Etwa drei Wochen, nachdem mit der Verfütterung von HCB bei Ratten begonnen wird, kommt es in Abhängigkeit von der Dosierung zu neuro-toxi-

schen Symptomen wie Krämpfen, Tremor und Lähmungen (24, 31, 32). Nach etwa 40 bis 70 Tagen der HCB-Exposition in Abhängigkeit von der applizierten HCB-Menge manifestiert sich die Porphyrie (gemessen an der stark erhöhten Porphyrin-Ausscheidung im Urin). Außer der porphyrinogenen Wirkung des HCB ist das chlorierte Benzol-Derivat ein starker Induktor der mischfunktionellen Monooxygenasen in der Leber (15, 18, 20, 21, 24, 39, 40).

1.4. THEMASTELLUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT

In zahlreichen Untersuchungen (12, 15, 16, 21) wurde in erster Linie die HCB-Wirkung auf das arzneimittel-metabolisierende System (Cytochrom P-450-abhängige mischfunktionelle Monooxygenasen) und den Porphyrin-Stoffwechsel an weiblichen Ratten untersucht. Dieses Enzymsystem (Cytochrom P-450) hat eine zentrale Bedeutung bei der Hydroxylierung lipophiler Arzneimittel und Fremdstoffe (41).

Es sollte jetzt untersucht werden, ob bei männlichen Ratten ebenfalls in ähnlicher Weise nach wenigen Tagen das Cytochrom P-450-System induziert wird und nach 40 bis 50 Tagen dann eine Porphyrie entsteht.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. TIERE UND VERSUCHSANORDNUNG

Männliche, ca. 200 bis 220 g schwere WISTAR-Ratten (Zentralinstitut für Versuchstierzucht Hannover /BRD) wurden mit 0.05 % HCB-haltigem Futter (Höveler Langenfeld/BRD) und Wasser ad libit. gefüttert.

Am 2., 6., 14., 25., 45., 51., 57., 64., 70., 80. und 90. Tag nach der HCB-Exposition wurden jeweils vier Tiere durch Dekapitieren getötet. Als Kontrollen dienten jeweils vier Tiere, die in gleicher Weise wie die HCB-Tiere gehalten wurden, deren Futter aber keinen HCB-Zusatz enthielt. Einen Tag vor der Untersuchung wurden die Tiere für 24 Stunden zum Sammeln des Urins in Stoffwechselkäfige gesetzt.

2.2. VERSUCHSANORDNUNG UND METHODEN

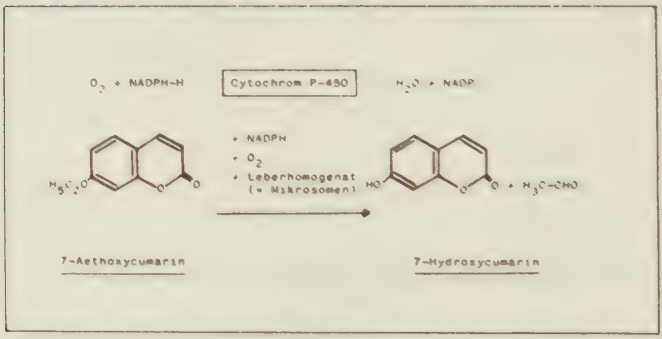
2.2.1. Herstellung des Leberhomogenats

Die Lebern wurden nach Bestimmung ihres Gewichts in eisgekühltem 0.01 M Tris-HCl-Puffer pH 7.6 gewaschen und anschließend in diesem Puffer im Verhältnis 1:10 (g Leber/ml Puffer) homogenisiert.

2.2.2. Bestimmung der Desalkylierungs-Aktivität (36, 37)

Durch die O-Desalkylierung (= Desaethylierung) des schwach fluoreszierenden 7-Aethoxycumarin entsteht das stark fluoreszierende 7-Hydroxycumarin (Umbelliferon) (s. Abb. 1), womit eine empfindliche Methode zur Verfügung steht, die es ermöglicht, die Cytochrom P-450-abhängige Desalkylierung im Leberhomogenat zu messen.

Abb. 1:
Umwandlung von 7-Aethoxycumarin zu 7-Hydroxycumarin (= Umbelliferon) unter Einwirkung von Lebermikrosomen, O_2 und NADPH.



Zur Optimierung der Enzym-Reaktion wurde zunächst das pH-Optimum bestimmt. Hemmversuche mit den bekannten Inhibitoren der 7-Aethoxycumarin-Desalkylierung (CO/O_2, Metyrapon, Naphthoflavon, Tetrahydrofuran) erlauben eine nähere Charakterisierung des induzierten Cytochrom P-450-Typ.

Dabei lassen sich zwei Cytochrom P-450 Typen unterscheiden:
Einmal das Cytochrom P-450 (= Cytochrom P-488), das durch aromatische Kohlenwasserstoffe induziert und durch Naphthoflavon gehemmt wird und das "eigentliche" Cytochrom P-450, das durch Phenobarbital induziert und durch Metyrapon gehemmt wird.

Die Bestimmung der Enzym-Aktivität und der MICHAELIS-Konstanten (K_M) erfolgten jeweils im pH-Optimum. Zur Bestimmung des pH-Optimum wurden gleiche Substrat-Konzentrationen (10^{-3} M Aethoxycumarin) in 0.01 M Tris-HCl-Puffer in einem pH-Bereich von 6.2 bis 8.6 gemessen, wobei die einzelnen Meßpunkte einen pH-Unterschied von 0.2 aufwiesen.

Durchführung der 7-Aethoxycumarin-Desaethylierung:

Meßansatz:
1 ml Küvette mit 1 cm Schichtdicke mit:
- 0.9 ml Substrat (Aethoxycumarin 10^{-3} M)
- 0.1 ml Homogenat
- 5 µl NADPH (3 x 10^{-2} M)

Die Suspension wurde etwa 5 Minuten bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 5 µl NADPH gestartet. Es wurde die Fluoreszenz-Emission bei 420 nm (Anregung bei 385 nm) über einen Zeitraum von 1 bis 2 Minuten gemessen und anschließend 1 µl Umbelliferon-Lösung (= 1 nMol) als Eichsubstanz dem Meßansatz zugegeben.

Die Bestimmung der K_M erfolgte mit unterschiedlichen 7-Aethoxycumarin-Konzentrationen, und zwar in Konzentrationen von

$$8.65 \times 10^{-4}\ M \quad \text{bis} \quad 2.5 \times 10^{-5}\ M.$$

Die Hemmung der Desalkylierungs-Aktivität erfolgte durch folgende Substanzen:

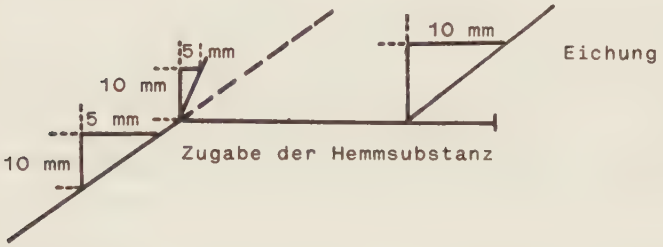
Metyrapon	1×10^{-5} M
Tetrahydrofuran	1×10^{-3} M
Naphthoflavon	1×10^{-5} M

oder aus einem Gasgemisch aus

CO/O_2 (CO/O_2 v/v 1/2).

Dabei wurde dem Versuchsansatz, dessen Reaktion mit NADPH gestartet wurde, nach einer Inkubationszeit von 1 Minute 10 µl der Hemmsubstanz zugegeben.

Beispiel zur Ermittlung von Aktivität und Hemmung:



Aktivität:

41 mm = 1 nMol Umbelliferon
15 mm = x nMol Umbelliferon

$$x = \frac{15 \times 1}{41}$$

x = 0.366 nMol Umbellferon/Min.

Mit Hemmsubstanz:

5 mm / 15 mm = 1/3 Rest-Aktivität

Hemmung somit 66 %

Die Protein-Bestimmung erfolgte nach LOWRY et al. (21).

2.2.3. Bestimmung der Porphyrine und ihrer Vorstufen

1. Quantitative Bestimmung der Porphyrine

Die quantitative Porphyrin-Bestimmung erfolgte mit Hilfe der Ionenaustauschersäulen nach Bio-Rad. Die Methode wurde in Anlehnung an die von DOSS und SCHMIDT (9) beschriebene Methodik durchgeführt.

Hierzu wurden 1 ml Urin auf eine Ionenaustauschersäule gegeben, die Säule mit 8 ml Aqua dest. gewaschen und anschließend mit 2 x 2 ml 3N HCl eluiert. Die Extinktion der Lösung wurde in einem Beckmann Acta C III Spektralphotometer bei den Wellenlängen 430 nm und 380 nm und in der Soret-Bande (ca. 404 nm) registriert. Anschließend wurden die Extinktionen korrigiert und mit Hilfe des mittleren Molekulargewichts (MG) der Gesamt-Porphyringehalt errechnet.

$$2 \times E_{Max} - (E_{430} + E_{380}) = E_{Corr}$$

$$E_{Corr} \times 4.74 = \mu g/ml \; (\times 1.000 = \mu g/l)$$

2. Quantitative Bestimmung von Porphobilinogen (PBG)

Die quantitative Bestimmung von PBG im Urin erfolgte in Anlehnung an die Methodik von DOSS und SCHMIDT (8).

PBG wurde mit Hilfe einer Anionenaustauschersäule aus

dem Urin isoliert und nach Elution mit Essigsäure mit modifiziertem Ehrlich's Reagens bestimmt. Dazu wurden 0.5 ml Urin auf die Säule gegeben, diese dreimal mit je 10 ml Aqua dest. gewaschen und das PBG mit 4 ml 1 M Essigsäure eluiert. Nach Zugabe des Ehrlich's Reagenz (4 ml) wurde die Extinktionslösung nach 15 Minuten bei 553 nm gegen einen Reagentien-Leerwert (4 ml 1 M Essigsäure) gemessen. Aus entsprechenden Eichkurven resultierte folgender Faktor:

$$\text{PBG } (\mu g/ml) = \frac{1 \text{ cm}}{E_{553 \text{ nm}}} \times 88 \times 1.000 = \mu g/l$$

3. Quantitative Bestimmung der 5-Aminolaevulinsäure (ALA)

Die quantitative Bestimmung der 5-Aminolaevulinsäure im Urin erfolgte ebenfalls in Anlehnung an die Methodik von DOSS und SCHMIDT (8).

Die Bestimmung der ALA wurde unter Verwendung einer Doppelionenaustauschersäule durchgeführt. Zunächst wurde an der oberen Säule (Anionenaustauscher) das störende PBG und der störende Harnstoff gebunden und die Säule verworfen. Anschließend wurde die ALA, die im Kationenaustauscher fixiert war, durch Zugabe von 7 ml 0.1 M Natriumacetat-Lösung eluiert und nach 15 Minuten die Extinktion durch Zugabe der Ehrlich's Reagens-Lösung bei 553 nm gemessen. Die Konzentrationen der ALA in den untersuchten Urin-Proben wurden nach folgender Formel ermittelt:

$$E_{553} \times 60 = mg/l$$

2.3. CHEMIKALIEN UND MATERIALIEN

1. Tris-HCl-Puffer — 0.1 M pH 7.6

2. 7-Aethoxycumarin — 10^{-3} M (MG = 190.2)
   47.6 mg/ml 0.01 M Tris-Puffer

   (Das 7-Aethoxycumarin wurde uns dankenswerterweise von Herrn Professor Dr. V. ULLRICH, Homburg/Saar überlassen.)

3. 7-Hydroxycumarin (Umbelliferon)
   (MG = 162.15)
   16.2 mg/100 ml Wasser
   (1 µl = 1 nMol)

4. NADPH — 3×10^{-2} M 25 mg/ml

5. Ehrlich's Reagenz-Lösung
   3 g p-Dimethylaminobenzaldehyd p.a. in 90 ml Essigsäure und 24 ml Perchlorsäure lösen und mit Essigsäure auf 150 ml verdünnen

6. Ionenaustauschersäulen (Fa. Bio-Rad, München/BRD)

7. Metyrapon — (MG = 226.28)
   10^{-5} in Wasser
   (Fa. Ciba-Geigy, Wehr b. Baden/BRD)

8. Tetrahydrofuran (THF) — (MG = 72.11)
   10^{-3} in Wasser
   (Fa. E. Merck, Darmstadt/BRD)

9. Naphthoflavon	(MG = 273.3) 10^{-5} M 27.33 mg in 1 ml Aceton lösen und erhitzen; davon 0.05 ml mit 5 ml Albumin-Lösung zusammengeben Albumin-Lösung: 30 mg Albumin/ml Wasser (Fa. Riedel de Haen, Hannover/BRD)
10. Hexachlorbenzol	98 % rein (Fa. Schuchardt, München/BRD)

2.4. GERÄTE

1. Potter Elvehjem Homogenisator
2. Fluoreszenz-Spektralphotometer (Zeiss PMQ 2)
3. Beckmann Spektralphotometer Acta C III

3. ERGEBNISSE BEI MÄNNLICHEN WISTAR-RATTEN

3.1. O-DESALKYLIERUNGSAKTIVITÄT FÜR 7-AETHOXYCUMARIN IN DER LEBER

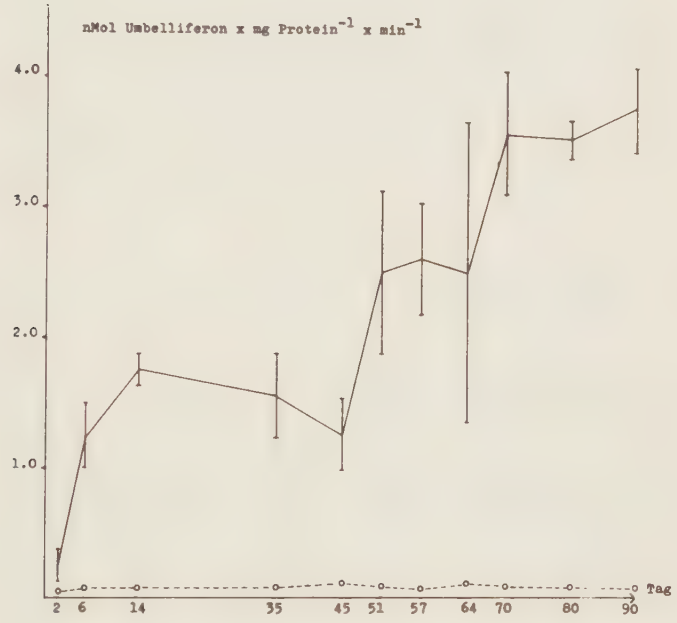
Die O-Desalkylierungsaktivität als Parameter der enzymatischen Aktivität des Cytochrom P-450-Systems steigt bei männlichen Ratten bereits in den ersten Tagen der HCB-Exposition stark an und weist bis zum 45. Tag Werte auf, die 15fach über denen der Kontrollen liegen. Vom 45. Tag an steigt die Aktivität noch einmal sprunghaft an und bleibt dann bis zum Ende des Versuchs etwa um das 30fache der Kontrollen erhöht (s. Abb. 2).

3.2. pH-OPTIMUM UND MICHAELIS-KONSTANTE DER ENZYMREAKTION

Das pH-Optimum der Desalkylierungsreaktion lag während der ersten drei Wochen des Versuchs bei den HCB-Tieren beider Geschlechter bei pH 8.0, während der Wert bei den Kontrolltieren 7.7 betrug. Am Ende des Versuchs sank das pH-Optimum bei den mit HCB behandelten Tieren auf einen Wert von 7.4 ab und entsprach damit weitgehend dem pH-Wert der Kontrolltiere zu diesem Zeitpunkt (s. Tab. 1).

Abb. 2

O-Desaethylierung von 7-Aethoxycumarin durch die Leber von HCB-behandelten männlichen Ratten und entsprechenden Kontrollen.



●——— männliche HCB-Tiere
o----- Kontrolltiere

Die spezifische Aktivität der O-Desaethylierung (nMol Umbelliferon x mg Protein^{-1} x min^{-1}) wird in Abhängigkeit von der HCB-Exposition (in Tagen) als Mittelwerte mit Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$) von jeweils vier männlichen Ratten dargestellt. Als Kontrollen dienten vier Normaltiere, von denen wegen der besseren Übersicht nur die Mittelwerte angegeben werden.

Tabelle 1

pH-Optimum und K_M der O-Desaethylierung von 7-Aethoxycumarin durch die Leber HCB-behandelter weiblicher und männlicher Tiere und entsprechender Kontrollen.

pH-Optimum				
Tag der Expos.	HCB ♀	HCB ♂	Kontr. ♀	Kontr. ♂
0	7.7	7.7	7.6	7.6
2	8.0	8.0	7.6	7.7
6	8.1	8.1	7.6	7.7
14	8.2	8.1	7.6	7.6
21	8.0	8.2	7.6	7.6
28	7.4	8.0	7.6	7.6
35	7.8	7.9	7.6	7.6
42	8.1	8.3	7.6	7.6
48	8.4	8.1	7.6	7.8
51	7.4	8.4	7.6	7.6
54	8.0	8.3	7.6	7.6
57	7.4	7.9	7.6	7.6
60	7.4	7.4	7.6	7.6
64	7.4	8.0	7.6	7.7
67	7.4	7.4	7.6	7.7
70		7.4		7.6
73		7.4		7.6
76		7.2		7.7
80		7.4		7.6

K_M (M)		
Tag der Expos.	♂	♀
10	1.0×10^{-4}	1.8×10^{4}
60	1.9×10^{-4}	1.6×10^{-4}

Dargestellt wird das jeweils am Versuchstag ermittelte pH-Optimum für weibliche und männliche mit HCB behandelte und Kontrolltiere. Die K_M wurden für beide Geschlechter am 10. und am 60. Tag ermittelt (Einzelheiten s. unter Methoden).

3.3. HEMMUNG DER ENZYMATISCHEN DESALKYLIERUNGSREAKTION

Die Hemmung der O-Desalkylierungsaktivität durch die bekannten Inhibitoren Metyrapon, Naphthoflavon, Tetrahydrofuran und CO/O_2 fielen unterschiedlich aus. Während sich die Hemmwerte für Naphthoflavon, Metyrapon und CO/O_2 bei den mit HCB behandelten Tieren und den Kontrolltieren nicht signifikant unterschieden, sank die THF-Hemmung der Enzym-Reaktion unter der HCB-Exposition deutlich ab (s. Abb. 3).

3.4. AUSSCHEIDUNG DER PORPHYRINE UND IHRER VORSTUFEN IM URIN

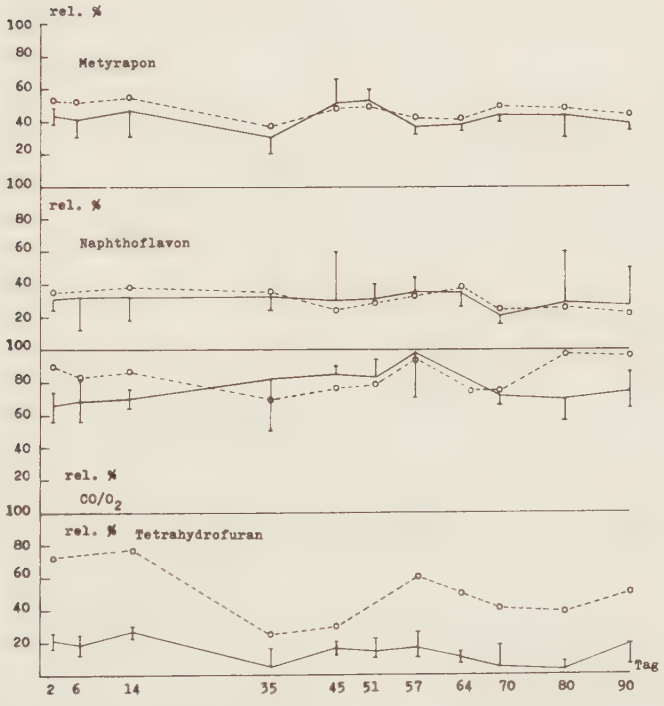
Die Ausscheidung der Porphyrine und der Porphyrin-Vorstufen lag bis zum 45. Tag im Normbereich. Sie stieg dann allmählich an, und vom 57. Tag an kam es zu einer starken Vermehrung der Porphyrin-Ausscheidung im Urin der Tiere, die mit HCB behandelt worden waren, und gegen Versuchsende hatte die Ausscheidung den 10fachen Wert der Kontrolltiere erreicht (s. Abb. 4).

Die Porphobilinogen-Ausscheidung stieg nach dem 51. Versuchstag an und erreichte am 57. Tag das 20fache der Kontrollwerte. Mit unterschiedlich starken Schwankungen blieb die PBG-Ausscheidung bis zum Versuchsende (90. Tag) stark erhöht (s. Abb. 4).

Die Ausscheidung der 5-Aminolaevulinsäure stieg bei den Versuchstieren im Vergleich zu den Kontrollen vom 45. Tag an kontinuierlich bis zum 64. Tag an und blieb bis zum Versuchsende auf diesen erhöhten Werten. Diese betrugen etwa das 4fache der Kontrollen (s. Abb. 4).

Abb. 3

Hemmbarkeit der O-Desaethylierungsreaktion von 7-Aethoxycumarin durch Metyrapon, Naphthoflavon, CO/O_2 und Tetrahydrofuran bei HCB-behandelten männlichen Ratten im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen.

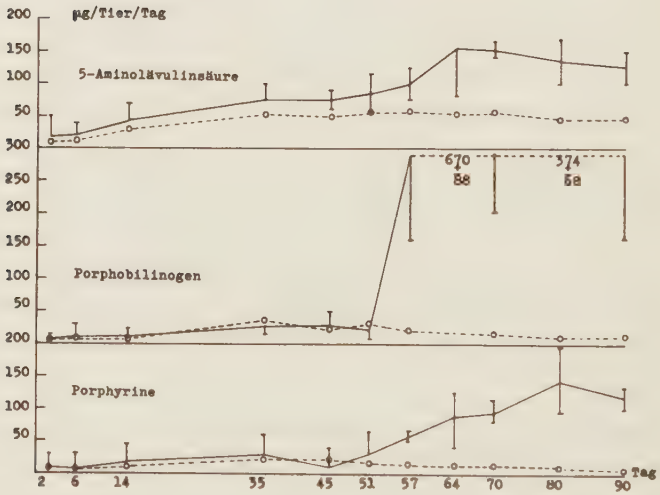


|——— männliche HCB-Tiere
o---- Kontrolltiere

Die Hemmung der O-Desaethylierung des 7-Aethoxycumarin nach Zugabe der Inhibitoren Metyrapon, Naphthoflavon, CO/O_2 oder Tetrahydrofuran. Es handelt sich um Mittelwerte und Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$) von jeweils vier männlichen Ratten. Von jeweils vier Kontrolltieren wurde nur der Mittelwert ($\bar{x}$) wegen der besseren Übersicht dargestellt.

Abb. 4

Ausscheidung der Porphyrine und Porphyrin-Vorstufen im Urin männlicher Ratten nach unterschiedlich langer HCB-Exposition.

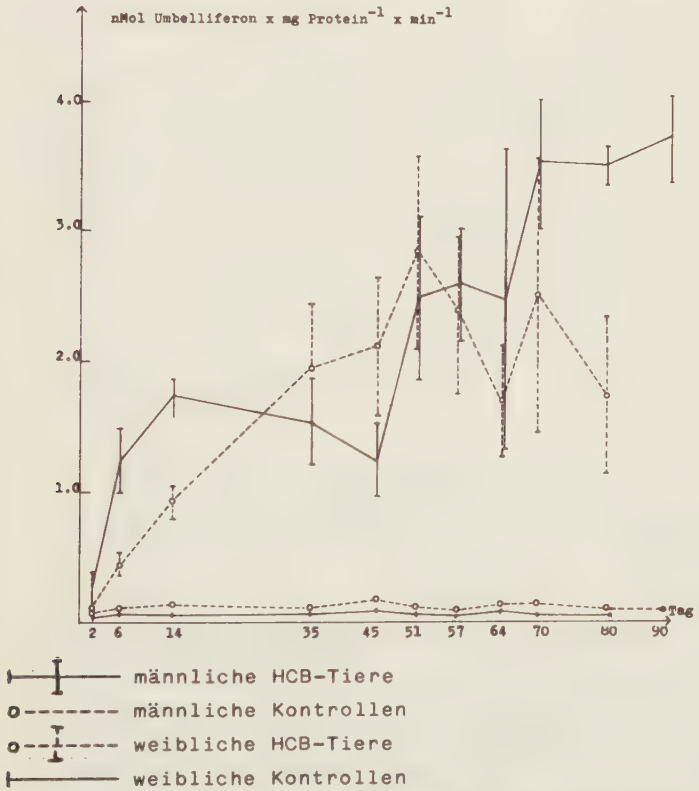


männliche HCB-Tiere
Kontrolltiere

Ausscheidung der Porphyrine, des Porphobilinogens und der 5-Aminolaevulinsäure (µg/Tier/Tag) im Urin männlicher Ratten. Die Angaben erfolgen als Mittelwert mit Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$) von jeweils vier Versuchs- und Kontrolltieren. Die Standardabweichung wurde bei den Kontrollen aus Gründen der besseren Übersicht weggelassen.

Abb. 5

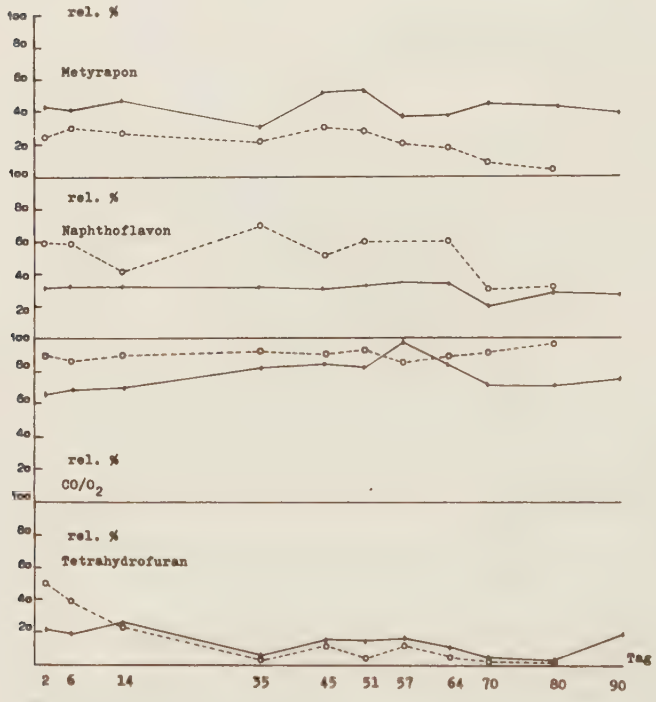
O-Desaethylierung von 7-Aethoxycumarin durch die Leber von HCB-behandelten männlichen und weiblichen Ratten und entsprechenden Kontrollen nach unterschiedlich langer HCB-Exposition.



Vergleich der Werte für die spezifische Aktivität der O-Desaethylierung von 7-Aethoxycumarin bei männlichen und weiblichen Ratten. Die Angaben erfolgen als Mittelwert und Standardabweichung ($\bar{x} \pm s$) von jeweils vier untersuchten Tieren. Bei den Kontrollen wurde aus Gründen der besseren Übersicht auf die Einzeichnung der Standardabweichung verzichtet.

Abb. 6

Hemmung der O-Desaethylierungsreaktion von 7-Aethoxycumarin durch die Inhibitoren Metyrapon, Naphthoflavon, CO/O_2 und Tetrahydrofuran bei männlichen und weiblichen Ratten nach unterschiedlich langer HCB-Exposition.

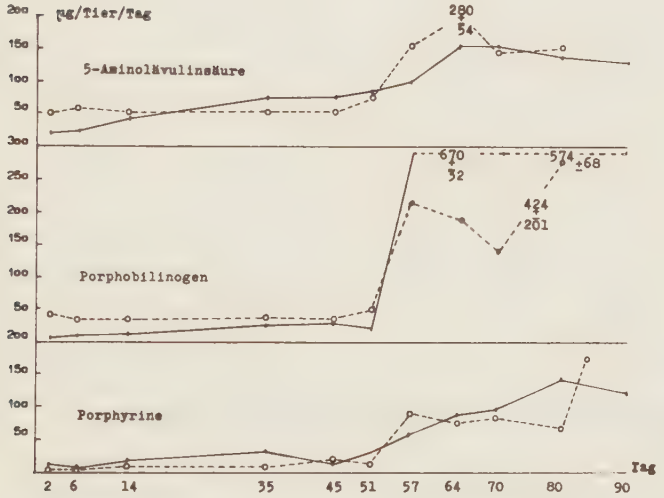


●——— männliche HCB-Tiere
○---- weibliche HCB-Tiere

Dargestellt ist der Vergleich der Hemmung der Aethoxycumarin-Desalkylierung in der Rattenleber bei männlichen und weiblichen, unterschiedlich lange mit HCB behandelten Versuchstieren mit Metyrapon, Naphthoflavon, dem Gasgemisch CO/O_2 und Tetrahydrofuran. Von jeweils vier Versuchstieren wurden Mittelwerte ($\bar{x}$) gebildet.
Zum Vergleich s. auch die Hemm-Muster bei Kontrolltieren (s. Abb. 3).

Abb. 7

Ausscheidung der Porphyrine und Porphyrin-Vorstufen im Urin männlicher und weiblicher Ratten nach unterschiedlich langer HCB-Exposition.

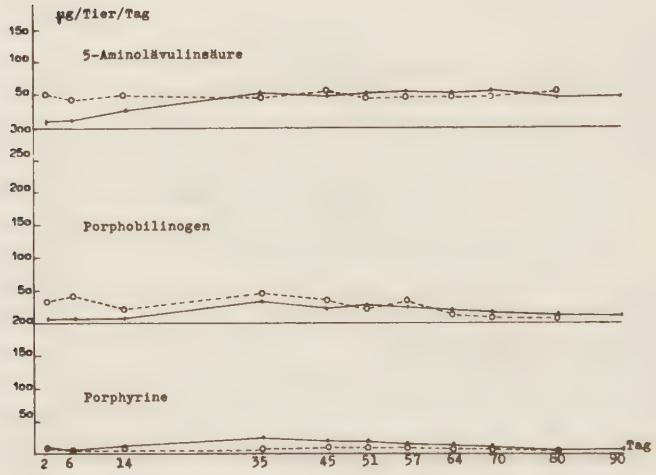


männliche HCB-Tiere
weibliche HCB-Tiere

Vergleich der Werte für die Porphyrine, Porphobilinogen und 5-Aminolaevulinsäure von jeweils vier männlichen und vier weiblichen Versuchstieren. Es handelt sich um Mittelwerte ($\bar{x}$). Die Standardabweichung wurde aus Gründen der besseren Übersicht weggelassen.

Abb. 8

Ausscheidung der Porphyrine und Porphyrin-Vorstufen im Urin männlicher und weiblicher Kontrolltiere nach unterschiedlich langer HCB-Exposition.



⊢——— männliche Kontrolltiere
O---- weibliche Kontrolltiere

Vergleich der Urin-Ausscheidung der Porphyrine, des Porphobilinogens und der 5-Aminolaevulinsäure bei Kontrolltieren. Dargestellt ist der Mittelwert ($\bar{x}$) von jeweils zwei weiblichen und vier männlichen Tieren.

Tabelle 2

O-Desalkylierung von 7-Aethoxycumarin durch die Leber von männlichen und weiblichen Kontrolltieren.

Tag	Spez. Aktivität nMol Umbelliferon x mg Protein^{-1} x min^{-1}	Spez. Aktivität nMol Umbelliferon x mg Protein^{-1} x min^{-1}
	männliche Tiere	weibliche Tiere
2	0.168 ± 0.0	0.053 ± 0.0
6	0.177 ± 0.0	0.056 ± 0.01
14	0.151 ± 0.0	0.094 ± 0.0
35	0.115 ± 0.0	0.146 ± 0.04
45	0.274 ± 0.243	0.049 ± 0.0
51	0.156 ± 0.0	0.037 ± 0.02
57	0.074 ± 0.0	0.034 ± 0.005
64	0.274 ± 0.07	0.078 ± 0.013
70	0.245 ± 0.01	0.095 ± 0.06
80	0.124 ± 0.0	0.097 ± 0.0
90	0.158 ± 0.04	

Die weiblichen und die männlichen Ratten, die als Kontrolltiere für die HCB-exponierten Tiere dienten (Tage = HCB-Expositionszeit der entsprechenden mit HCB behandelten Tiere) werden miteinander verglichen. Dabei zeigt sich eine relativ große Schwankung von Tag zu Tag bei beiden Geschlechtern. Außerdem liegen die Werte der spezifischen Aktivität der O-Desalkylierung von 7-Aethoxycumarin bei den männlichen Tieren fast ausnahmslos über den Werten der weiblichen.

4. DISKUSSION

Die Verfütterung von 0.05 % HCB enthaltendem Futter an männliche WISTAR-Ratten führt in den ersten Tagen der Exposition zu einem massiven Anstieg der Cytochrom P-450-Aktivität, gemessen an der O-Desalkylierungsaktivität des 7-Aethoxycumarin. Die Stärke und der Zeitpunkt der Induktion entsprechen den Befunden, die bei weiblichen Ratten erhoben wurden (15, 16, 32). Betrachtet man den weiteren Verlauf der Cytochrom P-450-Induktion, so findet sich noch eine zusätzliche Steigerung der Aktivität bei beiden Geschlechtern nach dem 50. Tag der HCB-Exposition. Damit zeigen sich also für die Cytochrom P-450-abhängige Desalkylierungsaktivität (gemessen an der 7-Aethoxycumarin-Desalkylierung) bei männlichen und weiblichen Ratten unter HCB-Gabe keine prinzipiellen Unterschiede. Bemerkenswert ist, daß bei den männlichen Kontrolltieren die Enzymaktivität jedoch statistisch über den Werten der weiblichen Kontrolltiere liegt (s. Abb. 5 und Tab. 2).

Die MICHAELIS-Konstante der 7-Aethoxycumarin-Desalkylierung betrug nach 60 Tagen HCB-Applikation für die männlichen Tiere 1.9×10^{-4} M und für die weiblichen Tiere 1.6×10^{-4} M. Somit unterscheiden sich die K_M für beide Geschlechter nicht. Im Gegensatz dazu läßt sich die HCB-induzierte K_M von der Phenobarbital- und Benzpyren-induzierten K_M abgrenzen (ULLRICH (38), GOERZ et al. (unveröffentlicht)).

K_M Phenobarbital:	2.7×10^{-5} M
K_M Benzpyren:	1.5×10^{-6} M

Dies spricht im Zusammenhang mit anderen Befunden (s. unten) vielleicht doch dafür, daß unter HCB-Gabe ein zusätzliches Cytochrom, das von dem Cytochrom P-450 (oder Phenobarbital-Typ) bzw. von dem Cytochrom P-448 (oder Benzpyren-Typ) abgrenzbar ist, induziert wird.

Zur weiteren Charakterisierung der Cytochrom P-450-Induktion wird von ULLRICH et al. (36, 37) eine unterschiedlich starke Beeinflußbarkeit der O-Desalkylierungsreaktion des 7-Aethoxycumarin durch verschiedene Hemmsubstanzen angegeben. Für die beiden Inhibitoren Naphthoflavon und Metyrapon ergibt sich in den angewendeten Konzentrationen keine Geschlechtsdifferenz für die Hemmbarkeit der HCB-induzierten O-Desalkylierungsaktivität des 7-Aethoxycumarin. Im Vergleich zu den Kontrollen zeigt das HCB-induzierte Cytochrom P-450 jedoch (besonders bei weiblichen Ratten) eine stärkere Naphthoflavon- und eine geringere Metyrapon-Hemmung (s. Abb. 6).

Die Hemmbarkeit der Cytochrom-abhängigen Enzym-Aktivität durch CO/O_2 nach HCB-Induktion ist bei männlichen und weiblichen Tieren gleich und unterscheidet sich nicht signifikant von den Werten der Kontrolltiere.

Ebenfalls ohne Geschlechtsunterschiede - aber im Gegensatz zu den Kontrolltieren - kommt es in Abhängigkeit von der Dauer der HCB-Einwirkung zum Abfall der Hemmung der Enzym-Reaktion durch Tetrahydrofuran.

Lediglich für die Naphthoflavon-Hemmung ergeben sich unter HCB-Applikation Unterschiede. Während sich bei den männli-

chen Tieren unter HCB keine Verschiebung der Naphtoflavon-Hemmung ergibt, nimmt die Hemmung durch Naphthoflavon bei den weiblichen Tieren im Vergleich zu den Kontrollen zu (15). Da beide Geschlechter jedoch eine unterschiedliche Naphthoflavon-Hemmung bei den Kontrollen zeigen (männliche Tiere ca. 40 %, weibliche Tiere ca. 25 %), fallen die Geschlechtsunterschiede unter Hexachlorbenzol weg, und es ergibt sich scheinbar kein Geschlechtsunterschied nach HCB-Applikation (s. Abb. 6).

Abgesehen von diesen geringen Geschlechtsdifferenzen zeigen die übrigen Befunde, daß bei beiden Geschlechtern durch HCB ein Cytochrom P-450-Typ induziert wird, der weder eindeutig dem Phenobarbital- noch eindeutig dem Benzpyren-Typ zuzuordnen ist. Die Induktionswirkung ist bereits einige Tage nach der Applikation von HCB nachweisbar, während sich die Porphyrie, gemessen an der Ausscheidung der Porphyrine und der Porphyrin-Vorstufen im Urin, erst nach einer Latenzzeit von 50 Tagen manifestiert, ein Phänomen, das bereits mehrfach beschrieben wurde (GRANT et al. (16), KUIPER-GOODMAN et al. (19), STONARD (31), SWEENEY (34)) (s. Abb. 7). Eine endgültige Erklärung für diesen Befund läßt sich heute noch nicht geben.

Die Ausscheidung der Porphyrine und ihrer Vorstufen (ALA und PBG) unterscheidet sich bei den Geschlechtern während der HCB-Langzeit-Exposition nur geringgradig und nicht signifikant. Die Ausgangswerte der Porphyrin-Ausscheidung im Urin bei den männlichen und bei den weiblichen Tieren

zeigen zwar Unterschiede, diese sind jedoch statistisch nicht signifikant:
Männliche Tiere (Gesamtporphyrine): 10 $\pm$ 7.0 µg/Tier/Tag
Weibliche Tiere (Gesamtporphyrine): 5.6 $\pm$ 1.2 µg/Tier/Tag

Bei den Kontrolltieren finden sich bei den Geschlechtern keine Unterschiede für die Ausscheidung der Porphyrin-Vorstufen (ALA und PBG). Im Verlauf der HCB-Applikation steigt die ALA-Ausscheidung bei den weiblichen Tieren stärker als bei den männlichen Tieren an.

Diese Untersuchungen bestätigen die Befunde von DOSS et al. (10, 11, 12) und von TSCHUDY und BONKOWSKY (35). Sexualhormone und deren Metaboliten führen unter verschiedenen Versuchsbedingungen zu einer Steigerung der ALA-Synthetase. Abgesehen von diesen Abweichungen finden sich keine prinzipiellen Unterschiede für die Porphyrin-Ausscheidung bei männlichen und weiblichen Ratten bei HCB-Gabe unter den hier gewählten Versuchsbedingungen.

Aufgrund dieser Befunde läßt sich feststellen, daß männliche und weibliche WISTAR-Ratten nach Applikation von 0.05 % HCB-haltigem Futter keine Geschlechtsdifferenzen, gemessen an der Porphyrin-Ausscheidung, aufweisen. Die Ausscheidung der Porphyrin-Vorstufe ALA steigt im Verlauf der HCB-Applikation bei weiblichen Ratten stärker als bei männlichen Ratten an. In dieser Hinsicht sprechen auch die Befunde von IPPEN et al. (17), wonach die kombinierte HCB- und Oestrogen-Behandlung die HCB-Porphyrie potenziert. Es ist vorstellbar, daß dies mit den höheren Oestrogen-Konzentrationen bei den weiblichen Tieren zusammenhängt.

Ebenso weist der Induktionsprozeß des Cytochrom P-450-Systems unter dieser HCB-Exposition keine prinzipiellen Geschlechtsunterschiede auf, wenn man von der gesteigerten Hemmbarkeit der O-Desalkylierungsreaktion durch Naphthoflavon bei weiblichen Tieren einmal absieht.

Im Gegensatz dazu haben KUIPER-GOODMAN et al. (19) festgestellt, daß nach Applikation von 0.5, 2.0, 8.0 oder 32.0 mg HCB/Tag/kg Körpergewicht durchaus Geschlechtsunterschiede auftreten können. Die hier verwendete HCB-Konzentration von 0.05 % als Futterzusatz entspricht der Versuchsgruppe von KUIPER-GOODMAN et al. (19), die eine Dosis von 32 mg HCB/Tag/kg Körpergewicht erhalten hatten. Bei den von diesen Autoren untersuchten Tieren handelte es sich um männliche und weibliche Charles River-Ratten (COBS). Sie stellten fest, daß bei der Verwendung einer HCB-Dosierung von 32 mg HCB/Tag/kg Körpergewicht die weiblichen Tiere wesentlich empfindlicher als die männlichen reagierten. Diese Geschlechtsunterschiede waren bei den von ihnen untersuchten Tieren in erster Linie bei der hohen HCB-Dosis (32 mg/Tier/Tag/kg Körpergewicht) ausgeprägt, wenngleich sie auch bei niedrigeren HCB-Dosen nachweisbar waren. Die Ursache für diese Unterschiede scheint eine prinzipiell unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber HCB für die verschiedenen Rattenstämme zu sein.

Wie bereits aufgeführt, entspricht die von uns verwendete HCB-Dosis einer Dosierung von 32 mg/Tier/Tag/kg Körpergewicht, wobei sich bei den von KUIPER-GOODMAN et al. (19) untersuchten weiblichen COBS-Ratten eine Letalität von 40 % fand, während bei unseren weiblichen WISTAR-Ratten

kein Tier verstarb. Somit ist nicht ausgeschlossen, daß auch bei unseren WISTAR-Ratten Geschlechtsunterschiede gegenüber der Toxizität des Hexachlorbenzol vorkommen können, die aber wahrscheinlich erst bei höheren HCB-Dosen auftreten werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Männliche und weibliche WISTAR-Ratten wurden über 90 Tage mit 0.05 % Hexachlorbenzol (HCB) enthaltendem Futter und Wasser ad libit. ernährt und mit einer entsprechenden Kontrollgruppe verglichen.

Während sich die Porphyrie (gemessen an der Ausscheidung der Porphyrine und der Porphyrin-Vorstufen 5-Aminolaevulinsäure und Porphobilinogen) erst 50 Tage nach Beginn der HCB-Applikation manifestierte, ließ sich bereits in den ersten Tagen eine gesteigerte Cytochrom P-450-Aktivität, gemessen an der O-Desalkylierung des 7-Aethoxycumarin, nachweisen.

Bei der Verwendung der verschiedenen Inhibitoren (Metyrapon, Naphthoflavon, CO/O_2 und Tetrahydrofuran) zur Charakterisierung des Cytochrom P-450-Typs zeigt sich, daß weder ein eindeutig dem Phenobarbital-Typ noch eindeutig dem Benzpyren-Typ zuzuordnendes Cytochrom durch HCB induziert wird.

Abgesehen von einer Geschlechtsdifferenz in der Hemmung der O-Desalkylierungsreaktion durch Naphthoflavon bei den Kontrolltieren fanden sich keine Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Ratten nach unterschiedlich langer HCB-Gabe. Ebenso waren bei beiden Geschlechtern - Kontrolltiere und HCB-behandelte Tiere - keine Unterschiede für pH-Optimum und MICHAELIS-Konstante der O-Desalkylierung des 7-Aethoxycumarin nachweisbar.

Daraus ergibt sich, daß bei den hier gewählten Versuchsbedingungen: 0.05 % HCB-Futterzusatz und WISTAR-Ratten (Zentralinstitut für Versuchstierzucht Hannover/BRD) keine Geschlechtsunterschiede vorliegen.

6. LITERATUR

1. BRODIE, M.J., R.J. MOORE and A. GOLDBERG:
Enzyme Abnormalities in the Porphyrias.
Lancet I, 699-701 (1977)

2. BURNS, J.E., F.M. MILLER, E.D. GOMES and R.A. ALBERT:
Hexachlorobenzene Exposure from Contaminated DCDA in Vegetable Sprayman.
Arch. Envir. Health 29, 192-194 (1974)

3. CAM, C.:
Cutaneous Porphyria Related to Intoxication.
Dirim (Istanbul) 34, 11-14 (1959)

4. CAM, C. and G. NIGOGOSYAN:
Acquired Toxic Porphyria Cutanea Tarda Due to Hexachlorobenzene.
J. Amer. med. Ass. 183, 88-91 (1963)

5. CAMPBELL, J.A.H.:
Pathological Aspects of Hexachlorobenzene Feeding in Rats.
S. Afr. J. Lab. Clin. Med. 9, 203-206 (1963)

6. CETINGIL, A.I. and M.A. OZEN:
Toxic Porphyria.
Blood 16, 1002-1011 (1960)

7. DeMATTEIS, F., B.E. PRIOR and C. RIMINGTON:
Nervous and Biochemical Disturbance Following Hexachlorobenzene Intoxication.
Nature (Lond.) 189, 363-366 (1961)

8. DOSS, M. und A. SCHMIDT:
Quantitative Bestimmung von 5-Aminolaevulinsäure und Porphobilinogen im Urin mit Ionenaustauschchromatographie-Fertigsäulen.
Z. klin. Chem. u. Biochem. 9, 99-102 (1971)

9. DOSS, M. and A. SCHMIDT:
Rapid Determination of Urinary Total Porphyrins by Ion Exchange Chromatography.
Z. klin. Chem. u. Biochem. 9, 415-420 (1971)

10. DOSS, M. und W. MEINHOFF:
Differenzierung hepatischer Porphyrinurien.
Dtsch. med. Wschr. 96, 1007-1012 (1972)

11. DOSS, M., D. LOOK, H. HENNING, P. NAWROCKI, A. SCHMIDT, W. DÖLLE, G. KORB, C.J. LÜDERS and G. STROHMEYER:
Hepatic Porphyrins and Urinary Porphyrin Precursors in Liver Cirrhosis.
Klin. Wschr. 50, 1025-1032 (1972)

12. DOSS, M., E. SCHERMULY and G. KOSS:
Hexachlorobenzene Porphyria in Rats as a Model for Human Chronic Hepatic Porphyrias.
Annals Clin. Res. 8, Suppl. 17, 171-181 (1976)

13. DOWDLE, E.B., D. GOLDSWAIN, N. SPONG and L. EALES:
The Pattern of Porphyrin Isomer Accumulation and Excretion in Symptomatic Porphyria.
Clin. Sci. Mol. Med. 39, 147-158 (1970)

14. EALES, L., E.B. DOWDLE, M.J. LEVEY and G.D. SWEENEY:
The Diagnostic Importance of Faecal Porphyrins in the Differentiation of the Porphyrias.
S. Afr. Med. J. 40, 380-382 (1966)

15. GOERZ, G., Th. KRIEG, K. BOLSEN und R. LISSNER:
Langzeit-Exposition von Ratten mit Hexachlorbenzol (HCB): Einfluß auf die Porphyrin-Ausscheidung im Urin und auf das Cytochrom P-450 in der Leber.
Arch. Derm. Res. 259, 199-206 (1977)

16. GRANT, D.L., F. IVERSON, G.V. HATINA and D.C. VILLENEUVE:
Effects of Hexachlorobenzene on Liver Porphyrin Levels and Microsomal Enzymes in the Rat.
Envir. Physiol. Biochem. 4, 159-165 (1974)

17. IPPEN, H., G. GOERZ und D. AUST:
Klinisch-experimentelle Untersuchungen zur Entstehung der Porphyrien.
Arch. Derm. Forsch. 245, 305-317 (1972)

18. KRIEG, Th., K. BOLSEN, G. GOERZ, R. LISSNER und V. ULLRICH:
O-Dealkylative Activity in Rat Liver Following Application of Hexachlorobenzene.
Arch. Derm. Res. 258, 109-110 (1977)

19. KUIPER-GOODMAN, J., D.L. GRANT, G.O. MOODIE, G.D. KORSARD and I.C. MUNRO:
Subacute Toxicity of Hexachlorobenzene in the Rat.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 40, 529-549 (1977)

20. LISSNER, R., G. GOERZ, M. EICHENAUER and H. IPPEN:
Hexachlorobenzene-Induced Porphyria in Rats. Relationship Between Porphyrin Excretion and Induction of Drug Metabolizing Liver Enzymes.
Biochem. Pharmacol. 24, 1729-1731 (1975)

21. LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR and R.S. RANDALL:
Protein Measurement with Folin Phenol Reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

22. MAINES, M.D. and A. KAPPAS:
Metals as Regulator of Heme Metabolism.
Science 198, 1215-1221 (1977)

23. MARVER, H.S. and R. SCHMID:
The Porphyrias.
in: STANBURY, J.B., J.B. WYNGAARDEN and D.S. FREDRICKSON (Eds.): The Metabolic Basis of Inherited Disease. pp 1087-1140
McGraw-Hill Book Co., London 1972

24. MEDLINE, A., E. BAIN, A.I. MENON and F. HABERMAN:
Metabolism and Rat Liver.
Arch Pathol. 96, 61-66 (1973)

25. NACHT, S., L.C. SAN MARTIN DE VIALE and M. GREENSTEIN:
Human Porphyria Cutanea Tarda. Isolation and Properties of the Urinary Porphyrins.
Clin. Chim. Acta 27, 445-452 (1970)

26. OCKNER, R.K. and R. SCHMID:
Acquired Porphyria in Man and Rat Due to Hexachlorobenzene Intoxication.
Nature (Lond.) 189, 499. (1961)

27. RAJAMANICKAM, C., J. AMZUTAVELLI, J. RAO and G. PADMANABAN:
Effect of Hexachlorobenzene on Heme Synthesis.
Biochem. J. 129, 381-385 (1972)

28. RIMINGTON, C. and G. ZIEGLER:
Experimental Porphyria in Rats Induced by Chlorinated Benzenes.
Biochem. Pharmacol. 12, 1387-1397 (1963)

29. SCHMID, R.:
Cutaneous Porphyria in Turkey.
New Engl. J. Med. 263, 397-398 (1960)

30. SIMON, N. and C. SIKLOSI:
Beeinflussung des Porphyrinstoffwechsels durch Umweltfaktoren.
Berufsdermatosen 22, 237-259 (1974)

31. STONARD, M.D.:
Effect of Hexachlorobenzene on Hepatic Microsomal Enzymes in the Rat.
Biochem. Pharmacol. 23, 2175-2183 (1974)

32. STONARD, M.D.:
Experimental Hepatic Porphyrin Induced by Hexachlorobenzene as a Model for Human Symptomatic Porphyria.
Brit. J. Haemat. 27, 617-625 (1974)

33. STONARD, M.D.:
Mixed Type Hepatic Microsomal Enzyme Induction by Hexachlorobenzene.
Biochem. Pharmacol. 24, 1959-1963 (1975)

34. SWEENEY, G.D.:
Patterns of Porphyrin Excretion in South African Porphyric Patients.
S. Afr. J. Lab. Clin. Med. 9, 182-190 (1963)

35. TSCHUDY, D.P. and H.L. BONKOWSKY:
Experimental Porphyria.
Fed. Proc. 31, 147-153 (1972)

36. ULLRICH, V. and P. WEBER:
The O-Desalkylation of 7-Ethoxycoumarine by Liver Microsomes.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 353, 1171-1177 (1972)

37. ULLRICH, V., V. FROMMER and P. WEBER:
Differences in the O-Desalkylation of 7-Ethoxycoumarine after Pretreatment with Phenobarbital and 3-Methyl-Cholanthrene.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 354, 514-520 (1973)

38. ULLRICH, V.:
Die Rolle des Cytochrom P-450 bei der Aktivierung von Pharmaka.
Arzneimittel-Forsch. 27, 1821-1827 (1977)

39. VOS, J.G., H.L. VAN DER MAAS, A. MUSCH and E. RAM:
Toxicity of Hexachlorobenzene in Japan Quails with Special Reference to Porphyria, Liver Damage, and Tissue Residues.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 18, 944-957 (1971)

40. WADA, O., Y. YANO, G. URATA and K. NAKAO:
Behaviour of Hepatic Microsomal Cytochromes after Treatment of Mice with Drugs Known to Disturb Porphyrin Metabolism in Liver.
Biochem. Pharmacol. 17, 595-603 (1968)

41. WELTON, A.F. and S.D. AUST:
Multiplicity of Cytochrome P-450 Hemoproteins in Rat Liver Microsomes.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 56, 898-906 (1974)

7. DANKSAGUNGEN

Herrn Professor Dr. Dr. A. GREITHER danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an seiner Klinik durchzuführen.

Herrn Professor Dr. G. GOERZ danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, für die vielfältigen Anregungen sowie für die Hilfeleistung bei der Abfassung der Dissertationsschrift.

Herrn Dipl.Chem. Dr. W. VIZETHUM danke ich für die methodischen und fachlichen Ratschläge.

Herrn K. BOLSEN danke ich für seine fachliche Hilfe bei der Durchführung der Arbeit.

Fräulein B. MÜNSTERMANN danke ich für die Unterstützung bei der Erstellung der Graphiken.

8. LEBENSLAUF

Am 21. Juni 1952 wurde ich, Werner Fuchs, als erstes Kind des Zahnarztes Fritz Fuchs und seiner Ehefrau Ursula, geb. Bartscher, in Krefeld-Uerdingen geboren.

1958 wurde ich in die Katholische Volksschule 55 am Marienplatz Krefeld-Fischeln eingeschult und wechselte 1962 nach bestandener Aufnahmeprüfung in das Mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium Fichte-Schule Krefeld. Diese Schule verließ ich 1969 und verbrachte meine letzten Schuljahre im Internat Schloß Ising/Chiemsee. Dort erhielt ich am 12. Juni 1971 das Zeugnis der Reife.

Mein Hochschulstudium begann ich an der Friedrich-Wilhelms-Universität in Bonn. Nach bestandenem Vorphysikum setzte ich mein Studium der Zahnheilkunde an der Universität Düsseldorf fort. Hier absolvierte ich die zahnärztliche Vorprüfung im Wintersemester 1975 und die zahnärztliche Prüfung zum Herbsttermin 1977 erfolgreich.